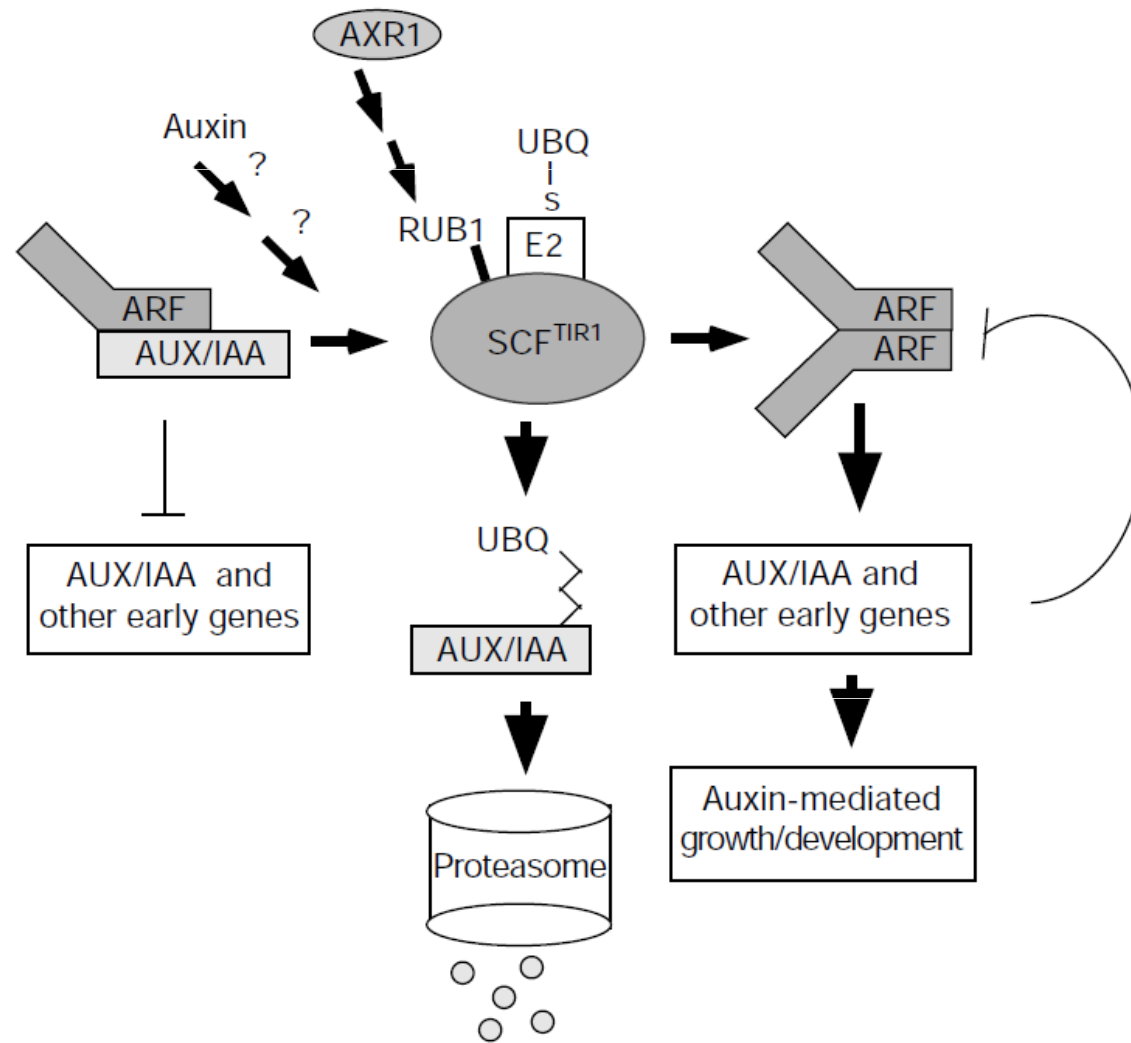


# Hypothetisches Modell des letzten Papers



# Thema des heutigen Papers

Current Biology, Vol. 13, 1418–1422, August 19, 2003, ©2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved. DOI 10.1016/S0960-9822(03)00536-0

## Auxin Action in a Cell-Free System

Nihal Dharmasiri,<sup>1</sup> Sunethra Dharmasiri,<sup>1</sup>

Alan M. Jones,<sup>2</sup> and Mark Estelle<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology

Indiana University

Bloomington, Indiana 47405

<sup>2</sup>Department of Biology

University of North Carolina

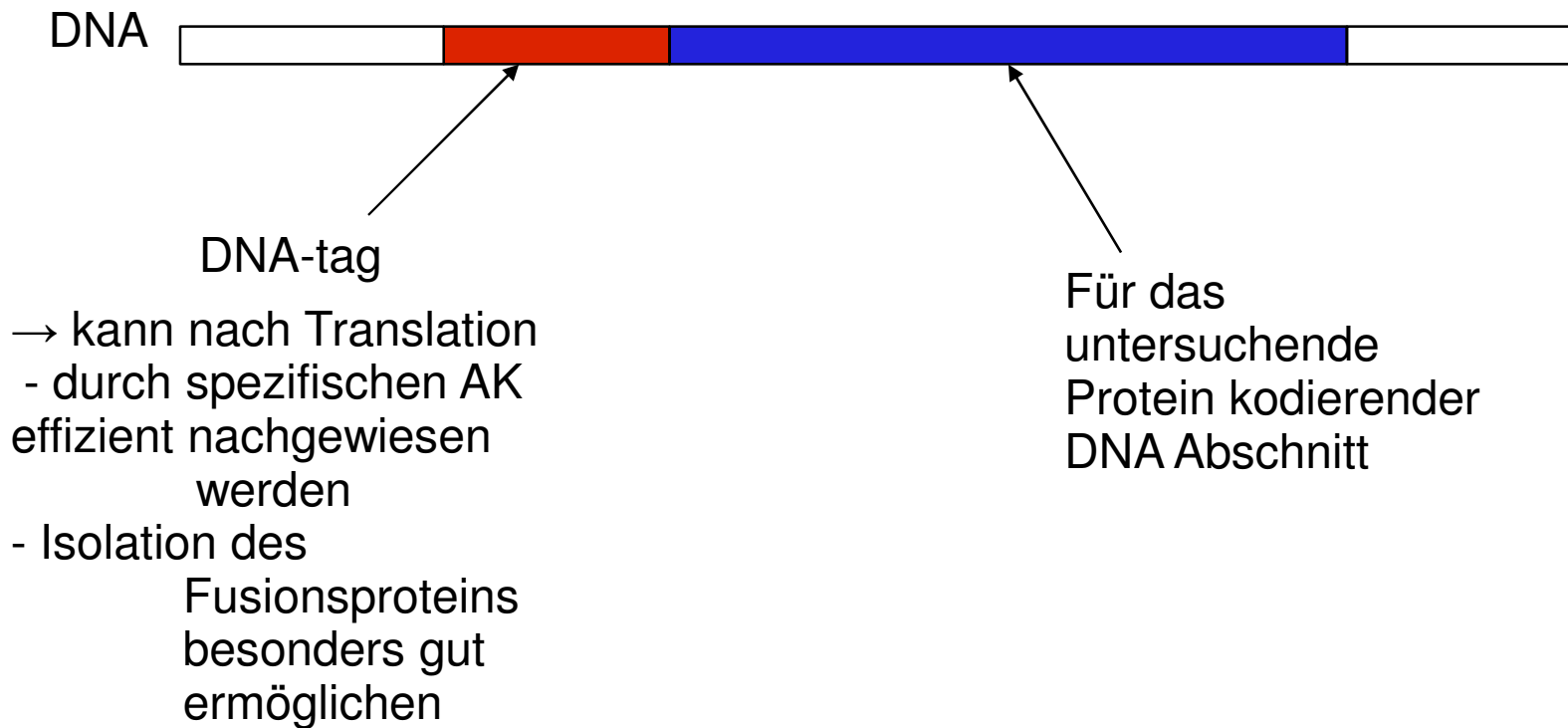
Chapel Hill, North Carolina 27599

### Zielstellung des Papers:

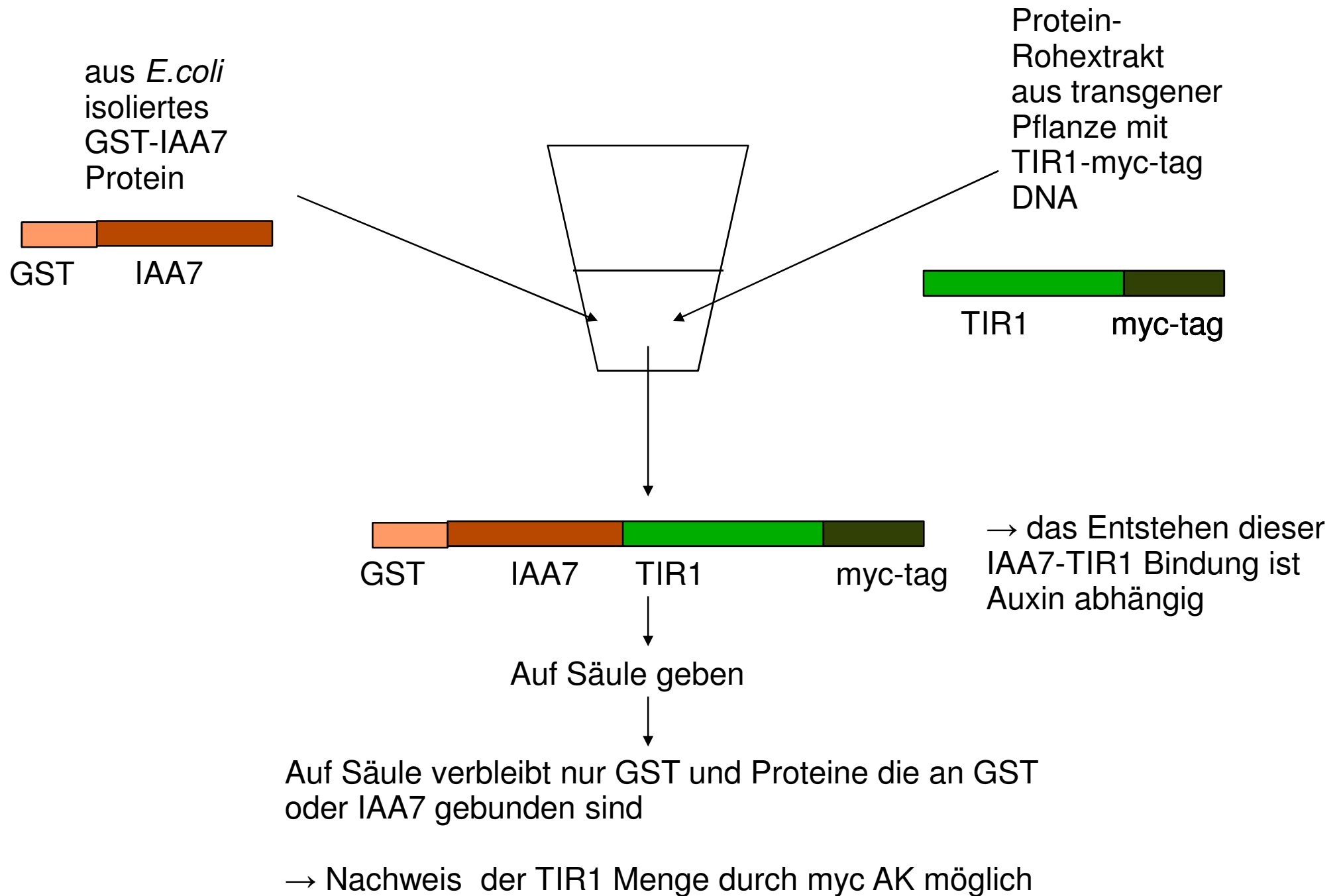
Untersuchung der Interaktionen zwischen Aux/IAA Proteinen und dem SCR<sup>TIR1</sup>-Komplex auf

- > mögliche Membranabhängigkeit
- > Einfluss von De- und Phosphorylierungen
- > Bedeutung 2er hochkonservierter Proline in Domäne II der Aux/IAA Proteine, sowie den Folgen einer Modifizierung dieser (durch Hydroxylasen und Isomerasen)

# Fusionsproteine

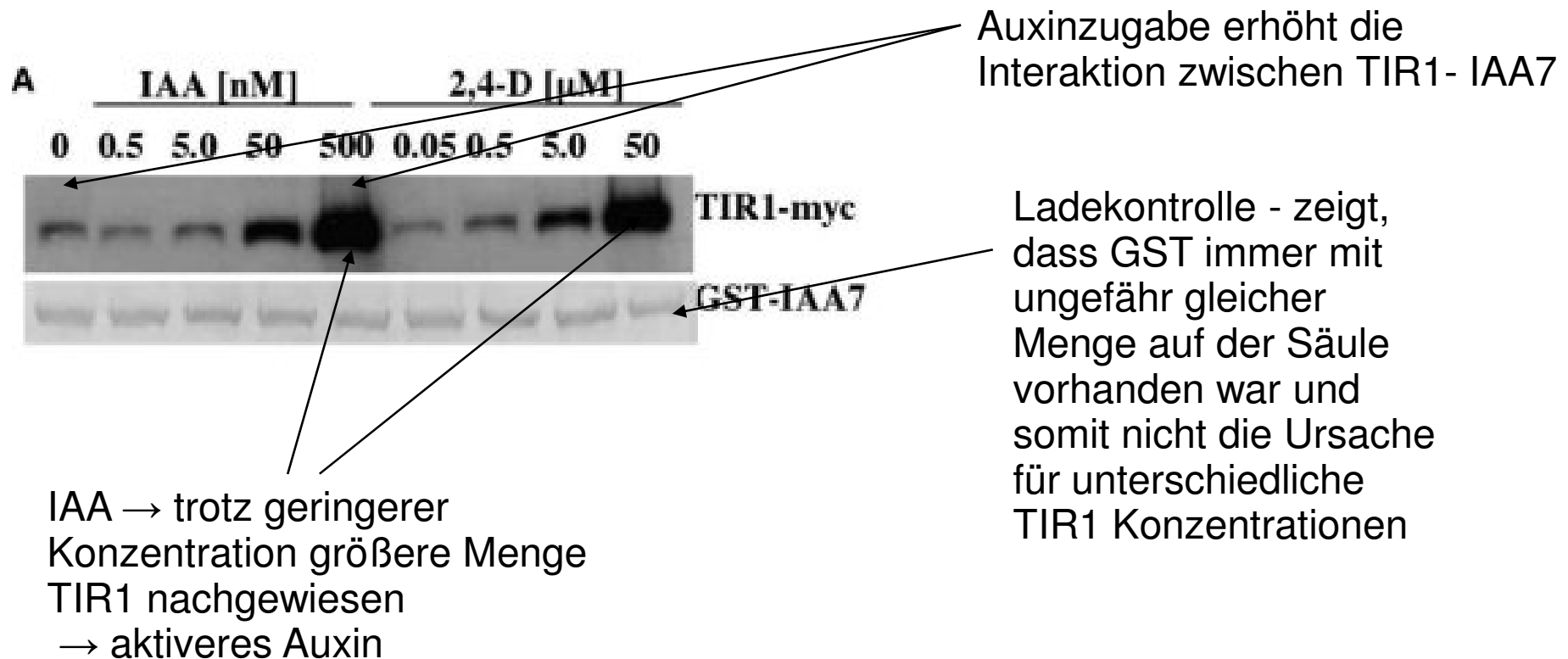


Bsp: → TIR1-myc  
→ GST-IAA7



# Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch Auxin gefördert

Test verschiedener Auxine und Repressoren (bzw ihrer Mutanten) in zellfreien Systemen.

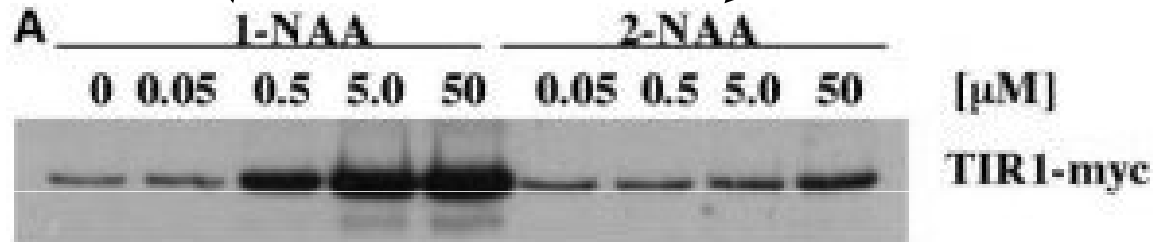


# Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch Auxin gefördert

Vergleich verschiedener Auxine

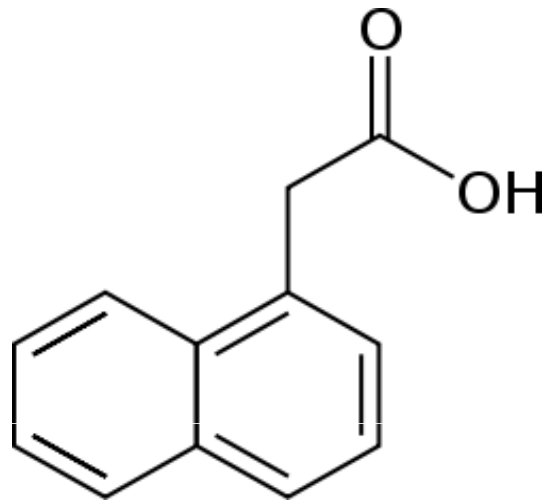
Aktives Auxin - TIR1  
Konzentration hoch

inaktive Form – TIR1  
Konzentration gering



NAA = Naphthalene acetic acid

Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch  
Auxin gefördert



1-NAA

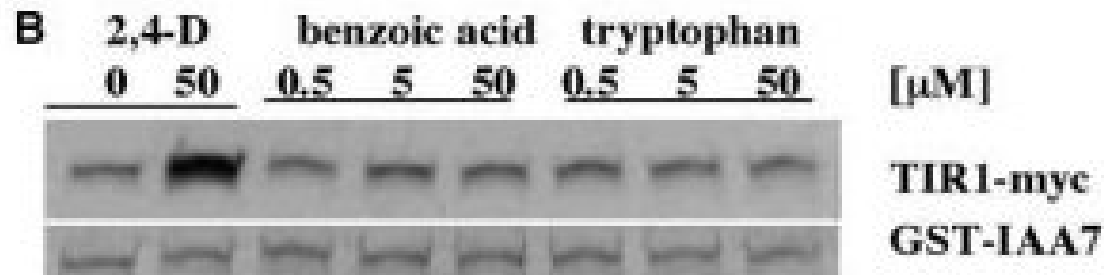
# Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch Auxin gefördert

Vergleich verschiedener Auxine

2,4 – D Zugabe  
- hohe TIR1  
Konzentration

Benzoessäurezugabe hat  
keinen Einfluss auf TIR1  
Konzentration

Zugabe von Tryptophan  
(Vorstufe aus Auxin  
Biosynthese)  
→ keinen Einfluss auf  
TIR1 Konzentration

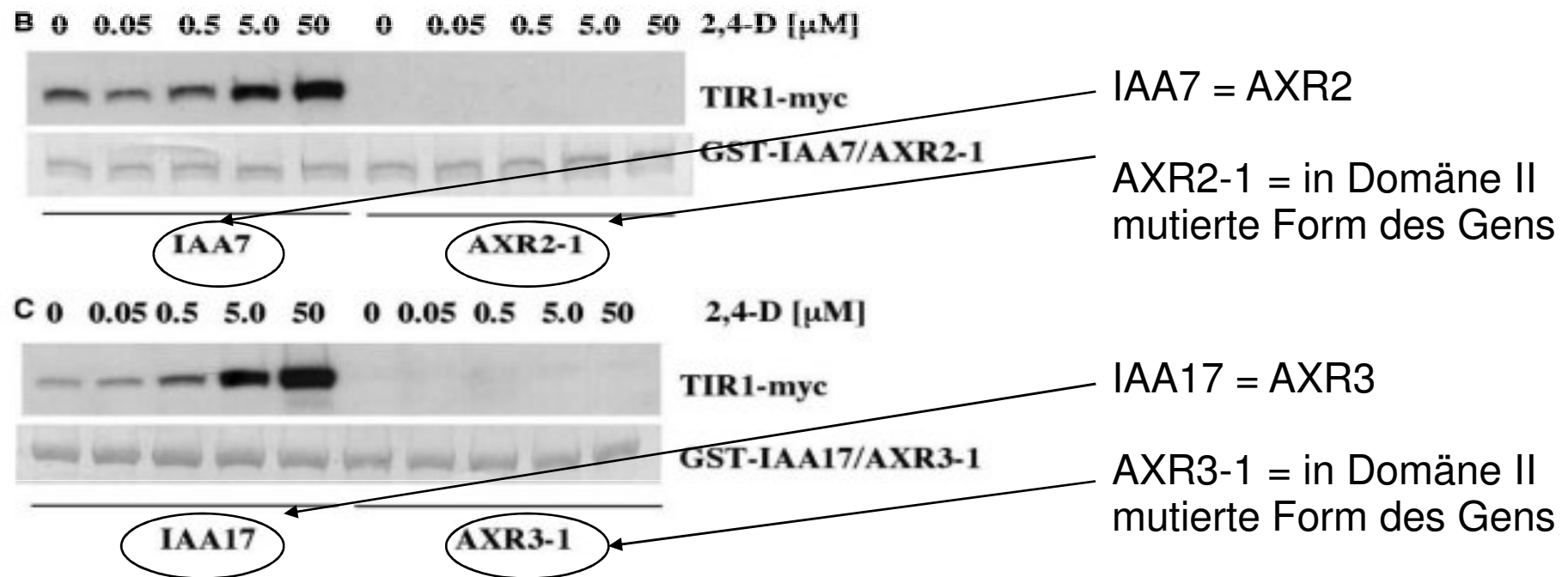


Anmerkung: in vivo  
weisen alle Auxine eine  
ähnlich Aktivität auf



# Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch Auxin gefördert ...

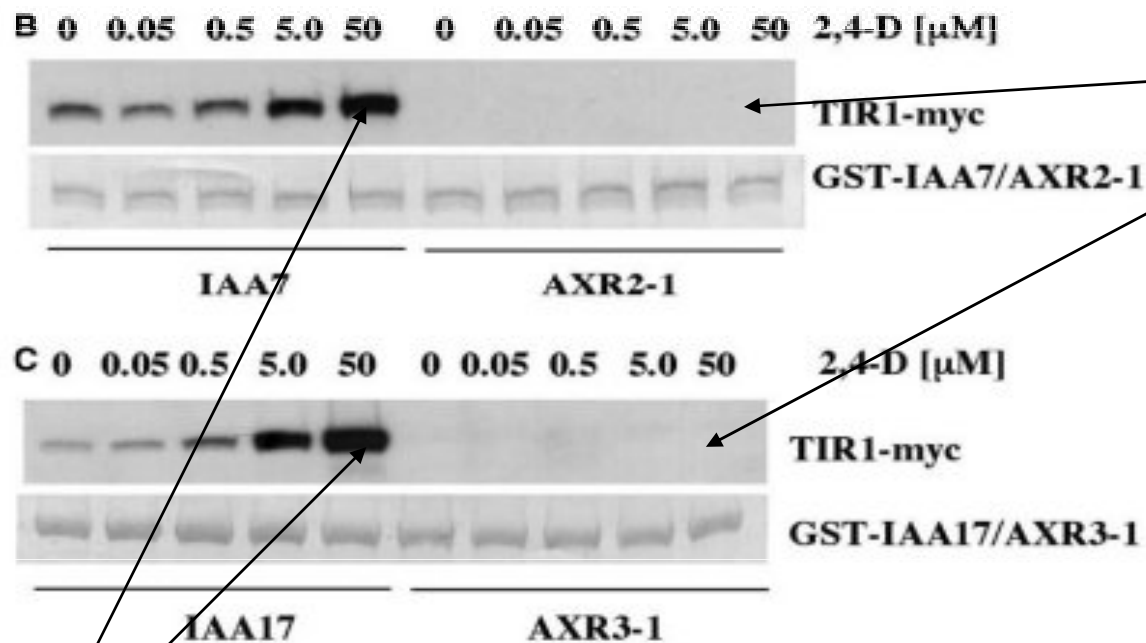
... setzt aber eine intakte Domäne II im Aux/IAA voraus!



Anmerkung: AXR2 und AXR3 sind 2 verschiedene Repressoren

# Die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion wird durch Auxin gefördert ...

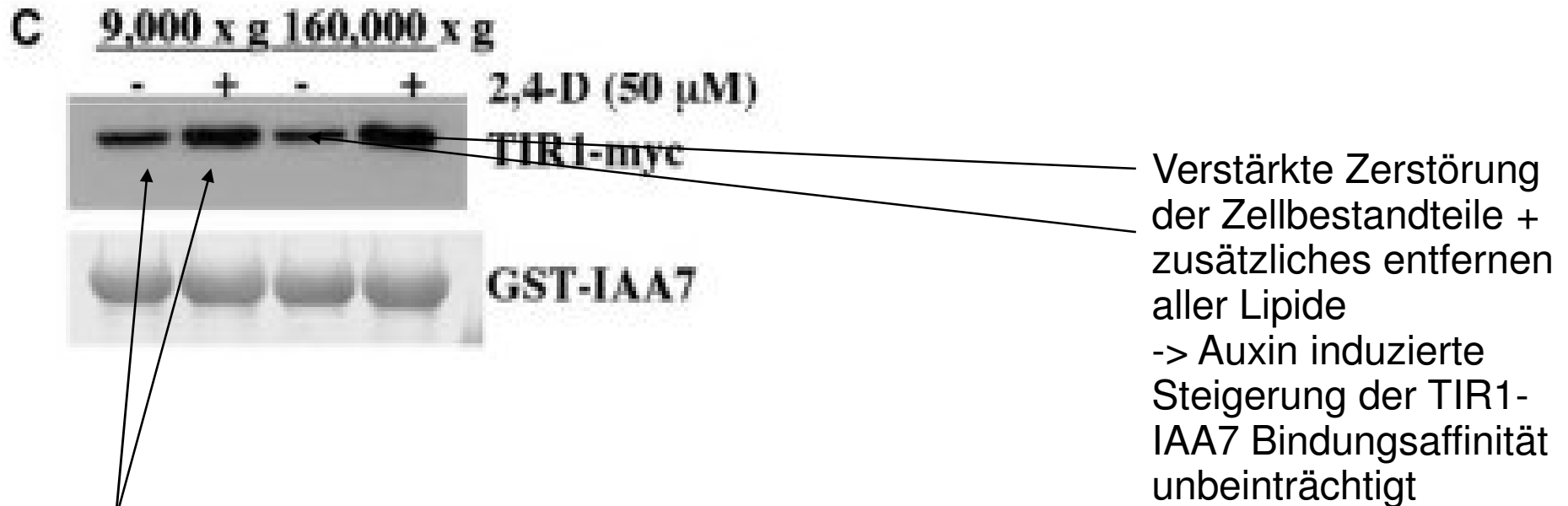
... setzt aber eine intakte Domäne II im Aux/IAA voraus!



Durch Domäne II Defekt sind AXR2-1 u. AXR3-1 nicht in der Lage TIR1 zu binden  
→ wird im Pulldown nicht mit festgehalten  
→ kein Nachweis via AK

IAA7 und IAA17 besitzen eine ähnliche Effizienz die die Aux/IAA-TIR1 Interaktion zu fördern

# Ist eine Intakte Membran/Zelle für die Aux/IAA - SCR<sup>TIR1</sup> Interaktion nötig?

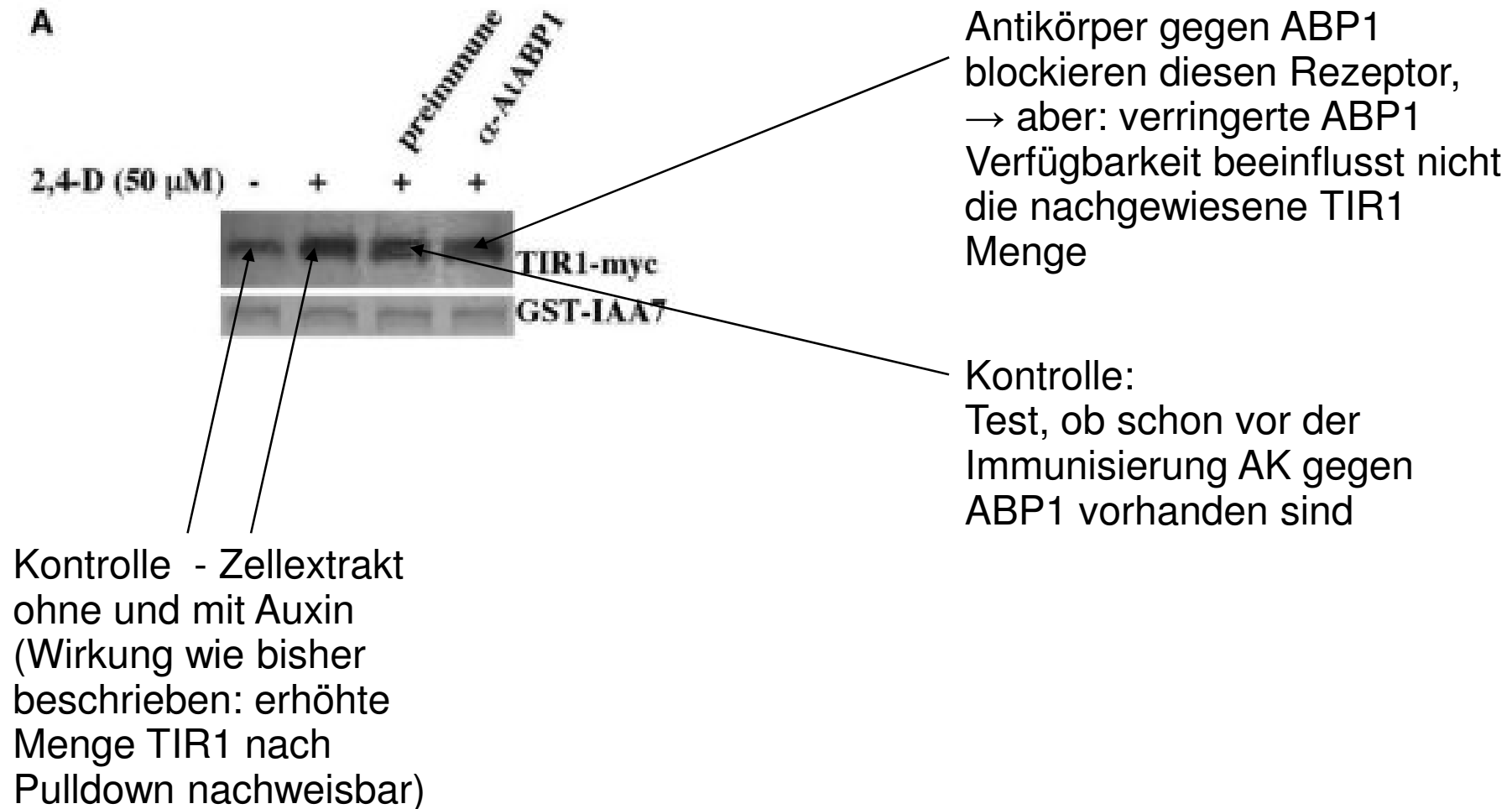


Zentrifugieren und zerstören der intakten Zellen hat keinen Einfluss!  
Auxinwirkung durch erhöhten TIR1 Nachweis noch immer zu erkennen

→ Rezeptor muss löslich sein  
→ membrangebundene Rezeptoren (zB. ABP1) können für die untersuchte Interaktion nicht verantwortlich sein

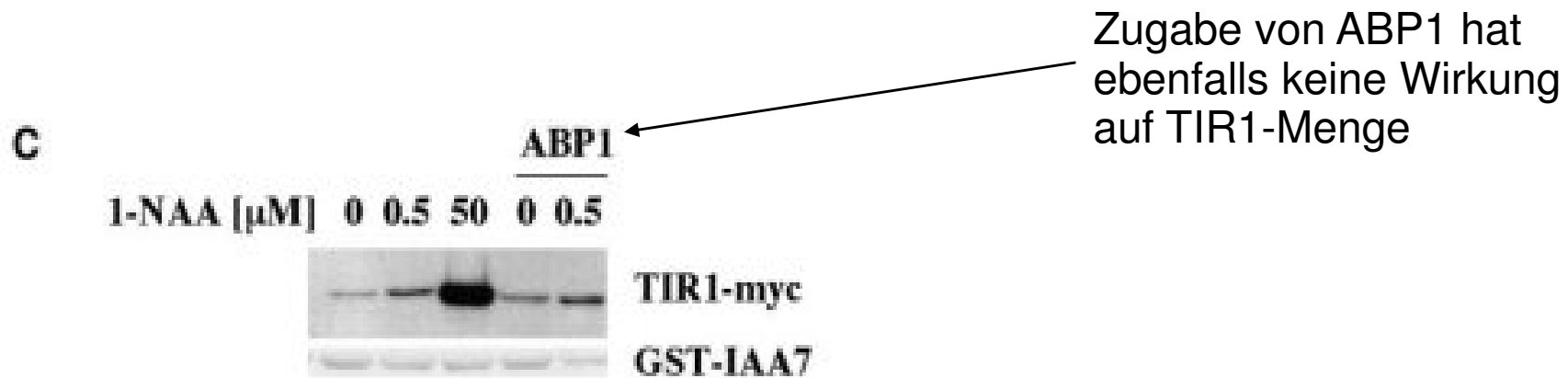
# Untersuchung des auxin binding proteins ABP1

Durch Zugabe von Antikörpern in den Protein-Extrakt.



# Untersuchung des auxin binding proteins ABP1

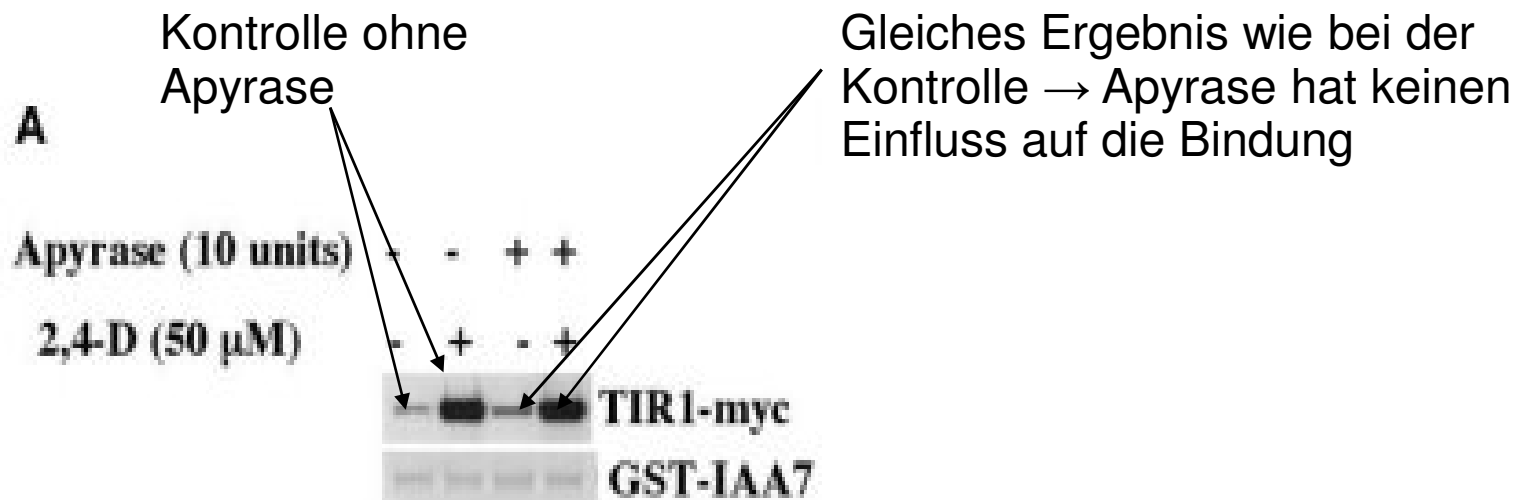
Zugabe von ZM-ABP1



- ABP1 an dieser Interaktion wahrscheinlich nicht beteiligt
- neuer Ansatz nötig
- Untersuchung von De- und Phosphorylierungen aufgrund ihrer großen Bedeutung in vielen anderen Signalwegen

# Benötigt die Aux/IAA – SCR<sup>TIR</sup> Interaktion Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung?

Test durch Zugabe von Apyrase (hydrolysiert ATP).



→ ATP ist nicht essentiell für die TIR1-IAA Bindungsaffinität

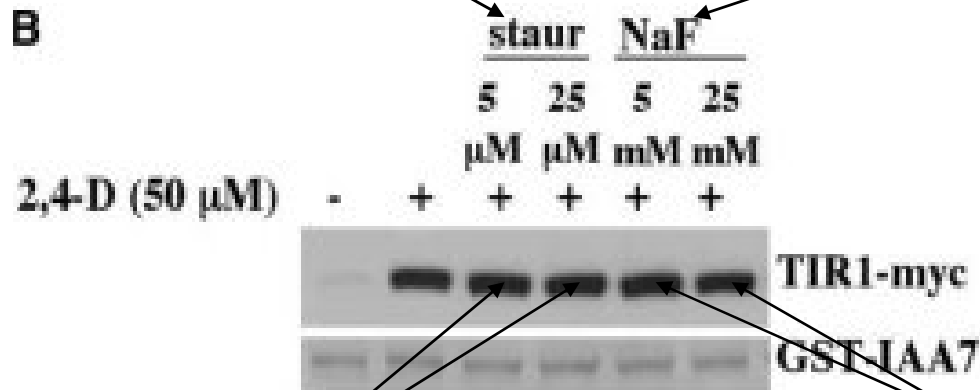
# Benötigt die Aux/IAA – SCR<sup>TIR</sup> Interaktion Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung?

Test durch Zugabe von Staurosporin und NaF.

hemmt  
Kinasen

hemmt Phosphatasen

**B**



Staurosporin hat keinen  
Einfluss auf die Bindung

Ebenfalls keinen Einfluss  
auf die Bindung

→ De- und Phosphorylierungen sind wahrscheinlich nicht an  
der TIR1-IAA Bindungsregulation beteiligt!

# Rolle der Domäne II Proline bei der Aux/IAA Erkennung durch SCF<sup>TIR1</sup>

- hochkonservierte Proline vorhanden
- Prolin-Hydroxylierung in Tieren wichtig zur Erkennung → Deswegen Fragestellung ob auch in unserem System wichtig
- Test verschiedener Prolinhydroxylaseninhibitoren
  - CO<sup>2+</sup>, DMOG, DLP
- Keine Effekte erkennbar → Daten nicht gezeigt
- Nicht auszuschließen das andere Prolinhydroxylasen beteiligt sind

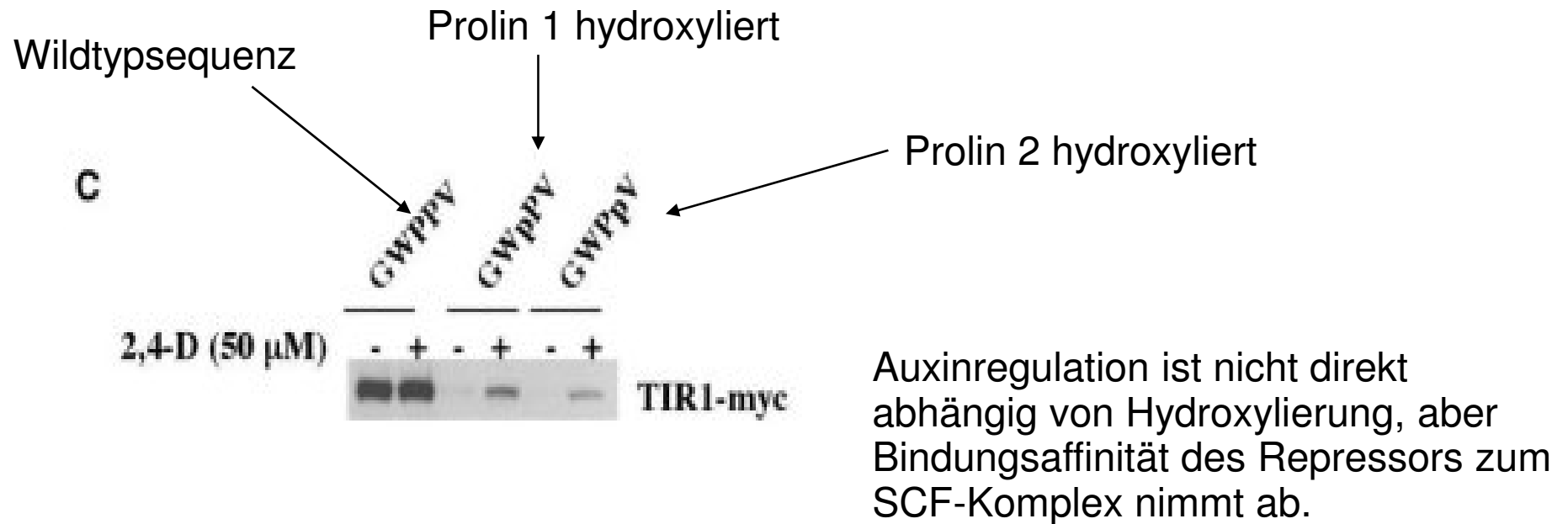


# Rolle der Domäne II Proline bei der Aux/IAA Erkennung durch SCF<sup>TIR1</sup>

- 3 Peptide synthetisiert → AS-Sequenz 73-88 des Aux/IAA (=großer Teil der Bindedomäne II mit konservierten Prolinen)
- AKAQVVGWPPVRNYRK (an 81. und 82. Stelle Proline)
- Peptide mit Biotin getagged zur Erkennung mit Streptavidin

# Rolle der Domäne II Proline bei der Aux/IAA Erkennung durch SCF<sup>TIR1</sup>

Untersuchung der Peptide mit hydroxyliertem Prolin.

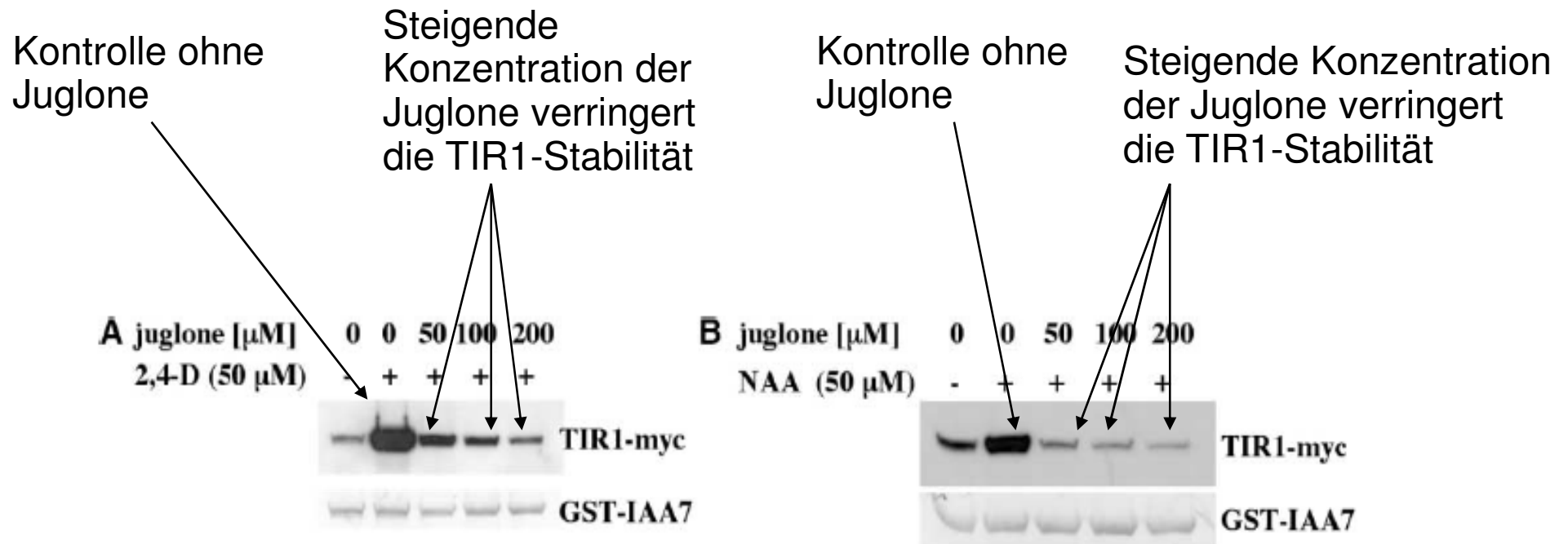


# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

- Isomerase = Umwandlung einer Verbindung in eine isomere Struktur
- 3 Familien von PPlasen
  - Cyclosporin → Inhibitor = Cyclophilin
  - FK506 binding proteins → Inhibitor = Rapamycin
  - Parvuline → Inhibitor = Juglone
- Nur Zugabe von Juglonen hat Einfluss auf die TIR1-Stabilität
- Wahrscheinlich Parvuline am pathway beteiligt

# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

Einfluss von Juglonen auf die Aux/IAA-SCF<sup>TIR1</sup>-Interaktion.

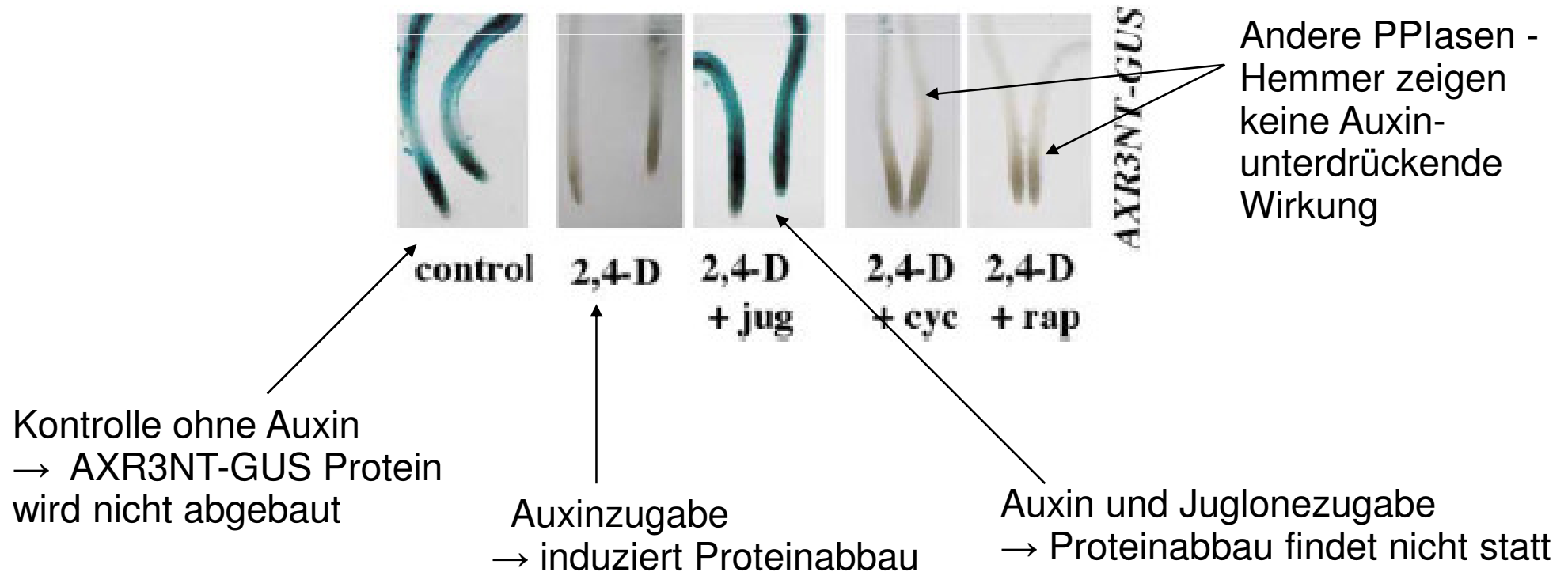


# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

- Test ob diese Reaktion auch in vivo abläuft.
- Pflanzen mit BA3::GUS und HS::AXRNT3-GUS
- BA3 Promotor durch Auxin induziert (Abbau Repressor)
- HS Promotor durch Hitzeschock (31°C bei 2 Stunden) induziert
- Besonders in Elongationszone der Wurzel aktiv
- Versuch mit Juglonen, Rapamycin, Cyclosporin
- These: Juglone hemmen die PPIase (der Parvulinfamilie) → keine Konformationsänderung → SCF<sup>TIR1</sup> kann den Repressor Aux/IAA nicht binden → Repressor wird nicht ubiquitiniert und nicht abgebaut

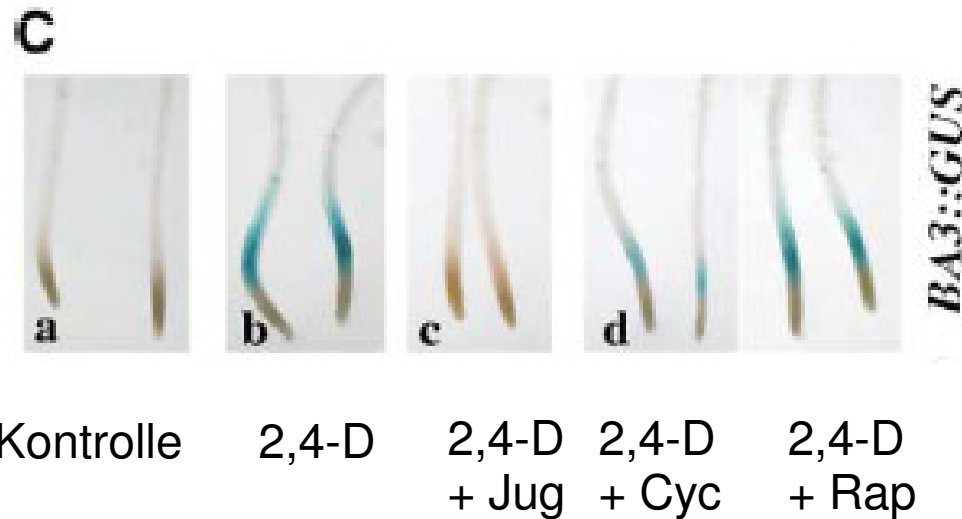
# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

Test mit AXR3NT-GUS Protein (aus vorherigen Studien bewiesen, dass es auxininduziert abgebaut wird)



# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

Untersuchung der PPlase-Aktivität in vivo.

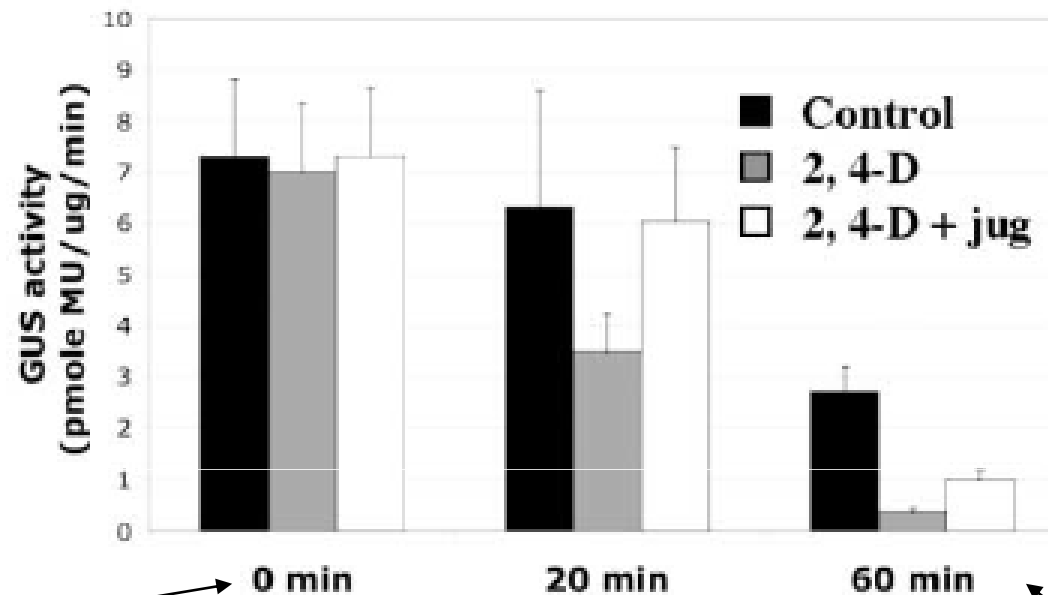


Wie schon in vitro, zeigen auch in vivo nur Juglone einen Einfluss auf den Auxin-Response  
→ Parvuline vermutlich beteiligt

# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

Test mit HS::AXR3NT-GUS Pflanze und Zugabe von Juglonen.  
Aktivität mit einem Fluorometer gemessen.

**D**



Zeit 0 →  
Zugabe von  
2,4-D  
Deswegen hier  
noch keine  
Unterschiede  
erkennbar

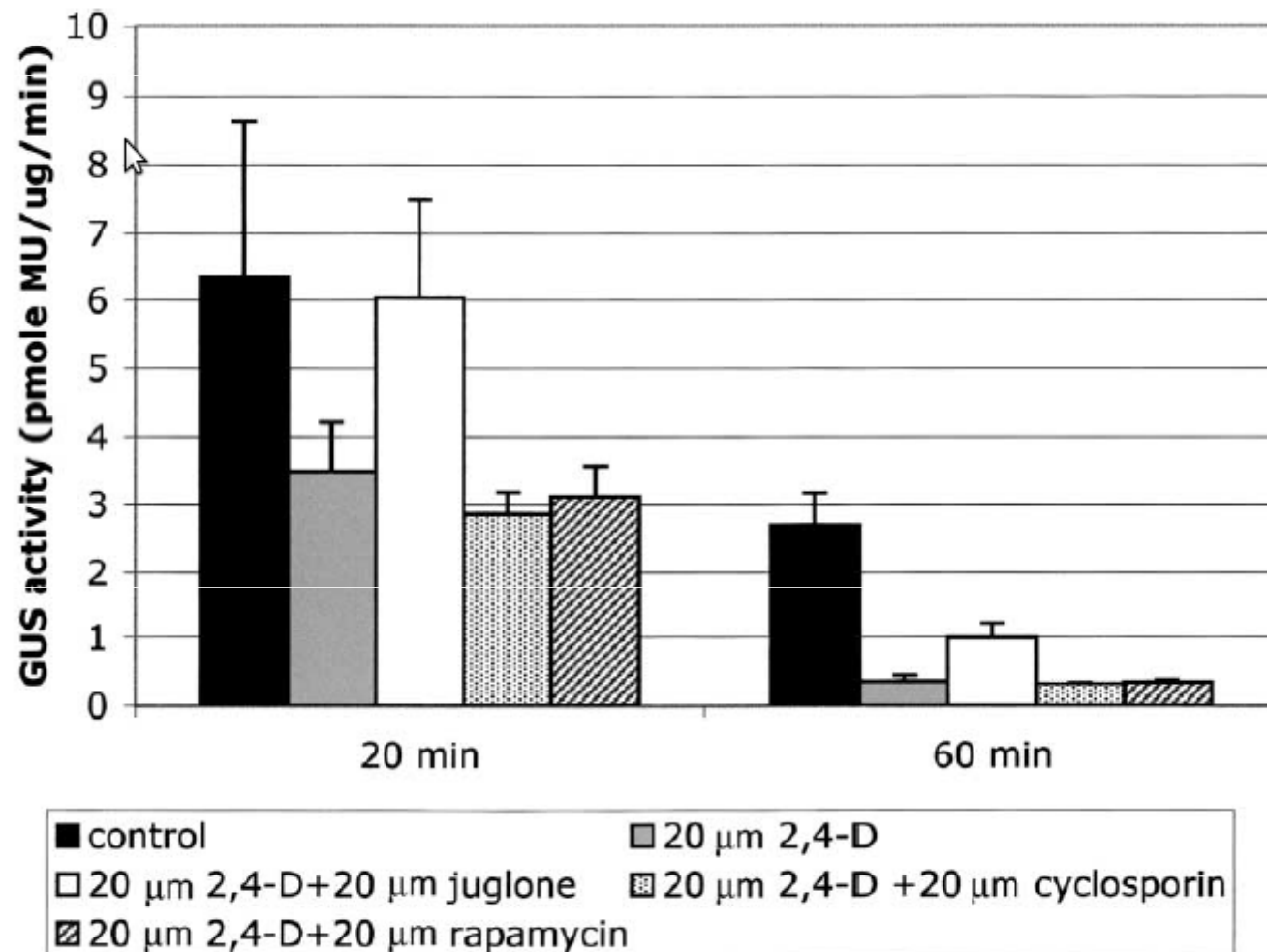
2,4-D Abbau des AUX3NT-  
GUS-Proteins  
Mit Juglonen -> kein Abbau

Bei 2,4-D  
AUX3NT-GUS  
fast komplett  
abgebaut.  
Mit Juglonen ist  
noch mehr  
vorhanden.  
(Kontrolle  
nimmt auch ab)



# Einfluss von Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase auf die Bindung von Aux/IAA und SCF<sup>TIR1</sup>

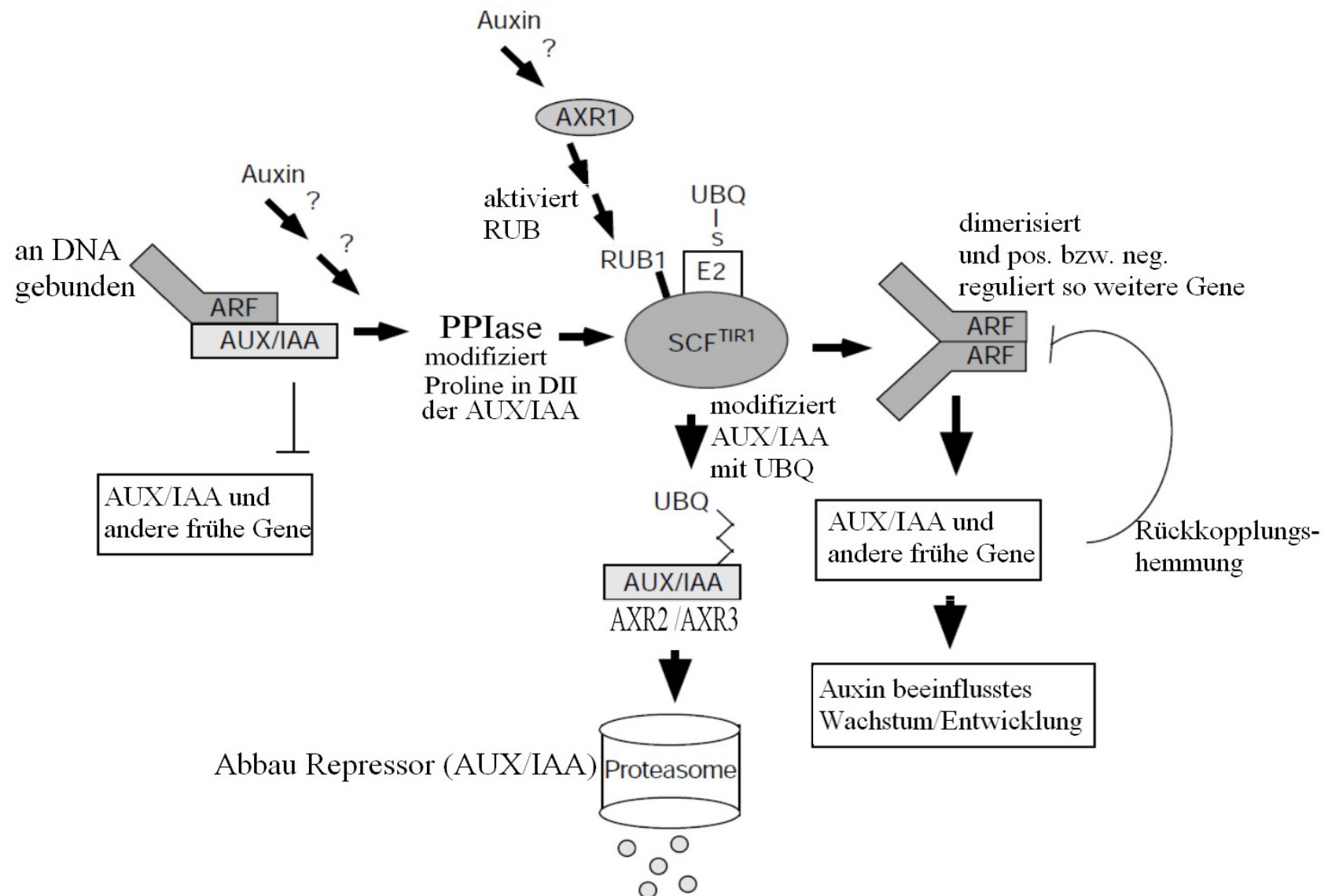
Gleicher Test → andere Darstellung mit Cyclosporin und Rapamycin.



# Zusammenfassung

- keine Membranabhängigkeit nachgewiesen
  - Auxinrezeptor welcher die Aux/IAA – SCR<sup>TIR1</sup> – Interaktion stimuliert ist löslich
- ABP1 (membrangebundener Rezeptor) für diese Bindung nicht von entscheidender Bedeutung
- das Vorhandensein von ATP hat scheinbar keinen Einfluss auf die Aux/IAA – SCR<sup>TIR1</sup> – Bindung
- De- und Phosphorylierungen (durch Phosphatasen/Kinasen) sind für die untersuchte Interaktion nicht von Bedeutung
- die beiden, in der Domäne II der Aux/IAA Proteine vorliegenden, hochkonservierten Proline sind entscheidend für den Bindungsaufbau des Aux/IAA – SCR<sup>TIR1</sup> – Komplexes
- die Regulation der Affinität erfolgt höchstwahrscheinlich über eine Konformationsänderung der Proline, ausgelöst durch peptidyl prolyl cis/trans Isomerasen (PPIase)

# Neues Modell



# Nächstes Paper

The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor

Katharia/Susanne